

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 9/12, 15/54, 15/81		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/07836 (43) Date de publication internationale: 18 février 1999 (18.02.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01788		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KG, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 11 août 1998 (11.08.98)			
(30) Données relatives à la priorité: 97/10287 12 août 1997 (12.08.97) FR			
(71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): COMMIS-SARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (CEA) [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75752 Paris Cedex 15 (FR). INSTITUT CURIE [FR/FR]; 26, rue d'Ulm, F-75248 Paris Cedex 05 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): FAYE, Gérard [FR/FR]; 1 Cité du Midi, 5bis, rue du Midi, F-94110 Arcueil (FR). VALAY, Jean, Gabriel [FR/FR]; 195, chemin des Communaux, F-38190 Bernin Cedex 22 (FR). MANN, Carl [US/FR]; 91, avenue Claude Nicolas Ledoux, F-78114 Magny les Hameaux (FR). THURET, Jean-Yves [FR/FR]; 12bis, rue Charles de Gaulle, F-91400 Orsay (FR).			
(74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title: KINASE ACTIVATING DEPENDENT CYCLIN PROTEIN KINASES, AND THEIR USES

(54) Titre: KINASE ACTIVATRICE DES PROTEINE-KINASES CYCLINE DEPENDANTES, ET SES UTILISATIONS

(57) Abstract

The invention concerns the family of protein-kinases having the following common characteristics: they are devoid of the consensus pattern GxGx(Y/F)GxV; they have a dependent non-cyclin CAK activity. The inhibitors of the protein-kinases of this family can be used as fungicides.

(57) Abrégé

Famille de protéine-kinases possédant les caractéristiques communes suivantes: elles sont dépourvues du motif consensus GxGx(Y/F)GxV, elles possèdent une activité CAK non-cycline dépendante. Des inhibiteurs des protéine-kinases de cette famille peuvent être utilisés en tant que fongicides.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

KINASE ACTIVATRICE DES PROTEINE-KINASES CYCLINE DEPENDANTES, ET SES UTILISATIONS

La présente Invention est relative à une nouvelle kinase de *Candida albicans*, activatrice des protéine-kinases cycline dépendantes, et à ses utilisations.

Les protéine-kinases cycline dépendantes (Cdk) sont des régulateurs du cycle de division cellulaire chez les eucaryotes, essentiels aussi bien au niveau de la transition G1/S que de la transition G2/M du cycle cellulaire. La CDC28 de *Saccharomyces cerevisiae* et la CDC2 de *Schizosaccharomyces pombe* sont les premières Cdk qui ont été identifiées.

L'activation des Cdk nécessite à la fois la fixation d'une molécule de cycline, et la phosphorylation de la Cdk sur un résidu thréonine conservé, situé dans une région appelée : « boucle T ».

Il a été montré que cette phosphorylation est effectuée par une kinase dénommée : « kinase activatrice des Cdk » (CAK), qui, chez les vertébrés, se présente sous forme d'un hétérotrimère comprenant une sous-unité catalytique dénommée Cdk7, une sous-unité de type cycline, dénommée cycline H, et un facteur MAT-1 [pour revue, cf. SOLOMON, Trends Biochem. Sci. 19, 496-500 (1994)]. Le complexe Cdk7-cycline H est en outre un composant du complexe TFIIH, nécessaire à la transcription basale des gènes par l'ARN polymérase II, et intervient dans la phosphorylation des séquences répétées du domaine carboxy-terminal (CTD) de la grande sous-unité de cette 30 polymérase.

Chez la levure scissipare *Schizosaccharomyces pombe*, un complexe similaire à Cdk7-cycline H, comprenant une sous-unité catalytique dénommée Crk1, et une cycline régulatrice dénommée Mcs2 a été identifié. Il a été montré que le gène Crk1 était essentiel pour la viabilité cellulaire, et il a été observé *in vitro* que le complexe

Crk1-Mcs2 était associé à l'activité CAK et à l'activité CTD-kinase [BUCK et al., EMBO J., 14(24), 6173-83 (1995) ; DAMAGNEZ et al., EMBO J., 14(24), 6164-72, (1995)].

Chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*, un complexe comprenant une kinase (Kin28) et une cycline (Ccl1) respectivement apparentées, au niveau de leur séquence, aux kinases Cdk7 et Crk1, et aux protéines régulatrices cycline H et Mcs2 a également été identifié. Le complexe Kin28-Ccl1 fait partie du complexe TFIIH et possède une activité CTD-kinase, mais n'intervient pas dans l'activité CAK.

Récemment, les inventeurs ont identifié une kinase responsable de l'activité CAK chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cette kinase a été dénommée CIV1 (CAK *in vivo*), et le gène correspondant a été dénommé CIV1 (THURET et al., Cell, 86(4), 1996). Ces résultats ont été confirmés par d'autres équipes [KALDIS et al., Cell, 86(4), 553-564 (1996) ; ESPINOZA et al., Science, 273(5282), 1714-1717 (1996)]. La CAK de *Saccharomyces cerevisiae* est globalement apparentée à la famille des sérine-thréonine-kinases, et en particulier aux protéine-kinases CDC2 et CDC28, et se différencie des CAK précédemment identifiées chez d'autres organismes par l'absence du motif conservé riche en glycines GxGx(Y/F)GxV, qui est présent dans la plupart des protéine-kinases, la présence d'insertions de 5 à 29 acides aminés, situées entre les éléments de structure secondaire conservés dans la famille des Cdk, et par le fait que son activité CAK ne nécessite pas son incorporation dans un complexe enzymatique.

L'activité CAK de CIV1 étant essentielle pour la survie et la division cellulaire, les Inventeurs ont entrepris de rechercher s'il existait, chez des levures pathogènes, des gènes homologues à CIV1, codant pour des protéine-kinases possédant une activité CAK. En effet, dans ce cas, l'obtention de moyens de régulation de cette activité, et en particulier d'inhibiteurs, présenterait

un grand intérêt sur le plan industriel ou thérapeutique, principalement pour l'obtention de fongicides.

Dans ce but, les Inventeurs ont d'abord entrepris le criblage de banques d'ADN de la levure pathogène 5 *Candida albicans*, en utilisant des sondes dérivées des différentes régions du gène CIV1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, aucune des sondes utilisées n'a permis de détecter la présence de séquences homologues dans le génome de *Candida albicans*.

10 Les Inventeurs ont toutefois recherché si *Candida albicans* possédait éventuellement un analogue fonctionnel de la CAK de *Saccharomyces cerevisiae*, en cherchant s'il existait chez *Candida albicans* un ou des gènes capables de restaurer chez *Saccharomyces cerevisiae* 15 la fonction CAK dans un mutant thermosensible du gène CIV1. Ils sont ainsi parvenus à identifier un gène de *Candida albicans* capable de complémenter à lui seul la fonction CAK déficiente du mutant.

La séquence de ce gène, dénommé CaCIV1, a été 20 déterminée ; elle est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ; la séquence de son produit de traduction, dénommé CaCIV1, est représentée sous le numéro SEQ ID NO:2.

La figure 1 représente la comparaison de la 25 séquence d'acides aminés (code 1-lettre) de CaCIV1, avec celle de la CAK de *Saccharomyces cerevisiae* (dénommée ScCIV1), et avec celle de la kinase CDC28 de *Saccharomyces cerevisiae* (dénommée ScCDC28). Les résidus conservés chez ScCIV1 et CaCIV1 sont en caractères gras.

30 Légende des annotations de la figure 1 :

k = résidu conservé dans la plupart des protéine-kinases ;

• = résidu souvent présent dans la famille des Cdk ;

35 ○ = résidu toujours présent dans la famille des Cdk ;

+ = résidu présent dans la famille des Cdk et dans ScCIV1 ;

Structures secondaires : a = hélice α ; b = feuillet β .

5 CaCIV1 ne présente au niveau de la séquence globale en acides aminés, qu'une identité de 28% avec la CAK de *Saccharomyces cerevisiae*, ScCIV1.

10 Cependant, les similitudes constatées entre ScCIV1 et CaCIV1 permettent de définir une famille de kinases, dénommée ci-après CIV1, regroupant des protéines possédant les caractéristiques suivantes :

15 - elles sont dépourvues du motif GxGx(Y/F)GxV, dans lequel G représente la glycine, x représente un acide aminé quelconque, Y/F représente soit la tyrosine soit la phénylalanine, V représente la valine.

- elles possèdent une activité CAK non-cycline dépendante.

20 La présente invention englobe les protéine-kinases appartenant à la famille CIV1 telle que définie ci-dessus, à l'exception de la CAK ScCIV1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

25 Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ladite protéine-kinase est susceptible d'être obtenue à partir d'un ascomycète, avantagusement un hémiascomycète, et de préférence *Candida albicans*.

Une protéine-kinase conforme à l'invention est par exemple représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2.

30 La présente Invention a également pour objet une séquence d'acide nucléique codant pour une protéine-kinase conforme à l'invention.

Une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention est par exemple constituée par la séquence SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe.

La présente invention a également pour objet des fragments d'acide nucléique d'au moins 18 pb, homologues ou complémentaires d'une séquence d'acide nucléique codant pour une séquence peptidique spécifique de la CAK 5 conforme à l'invention.

Ces fragments peuvent en particulier être utilisés comme sondes d'hybridation, et/ou amorces d'amplification, pour isoler et/cloner à partir de *Candida albicans*, une séquence d'acide nucléique codant 10 pour une CAK conforme à l'invention.

La présente invention englobe également des fragments d'acide nucléique d'au moins 15 pb, de préférence au moins 18 pb, homologues ou complémentaires d'une séquence d'acide nucléique codant pour une séquence pep- 15 tidique conservée dans la famille de protéine-kinases définie par la CAK CaCIV1 conforme à l'invention, et la CAK ScCIV1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ces fragments peuvent en particulier être utilisés comme sondes d'hybridation, et/ou amorces 20 d'amplification, pour détecter l'existence, chez des organismes autres que *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, de séquences codant pour des kinases apparentées aux CAK CaCIV1 et ScCIV1 et pour isoler et/ou cloner les gènes ainsi identifiés. L'invention englobe également 25 les séquences d'acide nucléique obtenues de la sorte, et les protéine-kinases de la famille des CAK CaCIV1 et ScCIV1 codées par ces séquences.

La présente invention a également pour objet tout vecteur recombinant, et en particulier tout vecteur 30 d'expression, résultant de l'insertion d'au moins une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention dans un vecteur approprié. Le choix d'un vecteur approprié peut être effectué aisément par l'homme du métier, parmi les nombreux vecteurs disponibles, selon la cellule-hôte 35 choisie pour multiplier et/ou exprimer un acide nucléique conforme à l'invention.

L'invention englobe également des cellules procaryotes ou eucaryotes transformées par une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention. Ces cellules transformées peuvent être utilisées en particulier pour exprimer une kinase conforme à l'invention, par exemple afin de la purifier à partir des cultures cellulaires, par exemple en utilisant des techniques similaires à celles précédemment décrites par les Inventeurs pour la CIV1 de *Saccharomyces cerevisiae*, (THURET et al., 1996, publication citée ci-dessus), ou bien afin de détecter son activité par un test approprié de viabilité cellulaire.

La mise en évidence par les Inventeurs de l'homologie fonctionnelle des kinases ScCIV1 et CaCIV1 permet d'envisager de nombreuses applications pour cette famille de kinases.

En particulier, du fait qu'il apparaît que l'activité CAK non cycline-dépendante de cette famille de kinases est essentielle pour la survie et la division cellulaire, des substances inhibitrices de cette activité peuvent être utilisables comme fongicides, soit en tant que médicaments, soit sur le plan industriel.

Par exemple, pour cibler des substances fongicides, telles que des substances actives sur *Candida albicans*, on mesure l'activité kinase de CaCIV1, ou de l'un de ses homologues fonctionnels constitué par une CAK non cycline-dépendante de la famille CIV1, en présence de chacun des produits dont on souhaite déterminer les propriétés fongicides, et l'on sélectionne les produits ayant un effet inhibiteur sur cette activité.

On peut effectuer un tel criblage en mesurant l'activité kinase d'une CAK de la famille CIV1, en présence d'activateurs ou d'inhibiteurs potentiels à tester. L'activité kinase peut par exemple être mesurée *in vitro*, soit directement en détectant la phosphorylation d'un peptide ou d'une protéine substrat, par exemple CDC28 ou Cdk2, ou la protéine MBP (myelin basic protein), dans un

mélange réactionnel approprié, soit indirectement, en détectant et/ou mesurant l'activité de la protéine substrat lorsque celle-ci dépend de la phosphorylation.

L'activité kinase peut également être mesurée
5 *in vivo*, par un test de viabilité cellulaire ; par exemple, l'activité kinase de CaCIV1 peut avantageusement être mesurée dans des cellules d'un mutant de *Saccharomyces cerevisiae* n'exprimant pas la CAK ScCIV1, transformées par le gène CaCIV1.

10 L'invention englobe également l'utilisation, d'un produit sélectionné comme indiqué ci-dessus pour ses propriétés inhibitrices d'une CAK non cycline-dépendante de la famille CIV1 pour l'obtention d'un fongicide

15 La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à un exemple illustrant la mise en évidence de l'activité CAK de CaCIV1, et le clonage du gène correspondant.

Exemple :

20 La souche de *Saccharomyces cerevisiae*, CMY975 (génotype CIV1-2 ura3 leu2 trp1 lys2 ade2 ade3) porte une mutation thermosensible du gène CIV1 et, de ce fait, pousse à 24°C, mais pas à 37°C.

25 Une culture de cette souche a été transformée par la méthode à l'acétate de lithium [SCHIESTL et GIETZ, Current Genetics, 16, 339-346, (1989)] avec une banque de fragments génomiques Sau3A de *Candida albicans* clonés dans le site BamHI du vecteur YEp24 (multicopie-URA3) [Botstein et al., Gene 8, 17-24, (1979)].

30 Les cellules CMY975 sont étalées sur des boîtes contenant un milieu synthétique dépouvu d'uracile, et cultivées à 37°C.

35 Dix colonies de CMY975 poussant dans ces conditions ont été obtenues. Les plasmides YEp24 contenant des inserts de *Candida albicans* ont été récupérés à par-

tir de chacune ces colonies, et amplifiés chez *Escherichia coli*.

La carte de restriction de chacun de ces plasmides a été établie, et a permis de constater que tous 5 les inserts provenaient d'une même région du génome de *Candida albicans*. Le séquencage de cette région a permis de mettre en évidence un même cadre ouvert de lecture codant pour une protéine kinase de 339 acides aminés, ce qui montre que les 10 inserts obtenus séparément correspondent 10 à un seul et même gène de *Candida albicans*. Ce gène a été dénommé CaCIV1.

La séquence de CaCIV1 est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1, et celle de la protéine CaCIV1 est représentée sous le 15 numéro SEQ ID NO: 2. La comparaison de la séquence de la protéine CaCIV1 avec les séquences disponibles sur les bases de données fait apparaître que cette protéine possède seulement 28% d'acides aminés identiques avec la CAK de *Saccharomyces cerevisiae* ScCIV1, et 24% d'acides aminés 20 identiques avec les Cdk ScCDC28 de *Saccharomyces cerevisiae* et la CaCDC 28 de *Candida albicans*.

Un fragment génomique BamHI-ClaI de 3 kb contenant le gène CaCIV1 a été sous-cloné dans le plasmide centromérique TRP1 pRS414 [SIKORSKI et HIERTER, Genetics, 25 122, 19-27 (1989)]. Ce plasmide a été utilisé pour transformer un mutant de *Saccharomyces cerevisiae* dans lequel la séquence ScCIV1 est délétée du génome et contenant le gène ScCIV1 sur un plasmide répliquatif portant également le gène de sélection URA3 (souche CMY116 du génome ura3 30 leu2 trp1 lys2 civ1 LEU2/pJG43 (URA3-ScCIV1)). Les cellules transformées avec le plasmide pRS414-CaCIV1 sont viables après la contre-sélection et la perte du plasmide pJG43 (URA3-ScCIV1), ce qui confirme que le gène CaCIV1 peut fonctionner à la place du gène essentiel ScCIV1. 35 Donc, CaCIV1 code pour un homologue fonctionnel de ScCIV1, et suffit à restaurer l'activité CAK.

REVENDICATIONS

1) Protéine-kinase, appartenant à la famille dénommée CIV1 définie par les caractéristiques suivantes :

5 - elle est dépourvue du motif GxGx(Y/F)GxV, dans lequel G représente la glycine, x représente un acide aminé quelconque, Y/F représente soit la tyrosine soit la phénylalanine, V représente la valine ;

10 - elle possède une activité CAK non-cycline dépendante ;

à l'exception de la CAK ScCIV1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

15 2) Protéine-kinase selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue à partir de *Candida albicans*.

3) Protéine-kinase selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle répond à la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2.

20 4) Acide nucléique codant pour une protéine-kinase selon une quelconque des revendications 1 à 3.

5) Vecteur recombinant, résultant de l'insertion d'un acide nucléique selon la revendication 4 dans un vecteur approprié.

25 6) Procédé de criblage de produits fongicides, caractérisé en ce qu'il comprend une étape où l'on mesure l'activité kinase d'une CAK non cycline-dépendante de la famille CIV1 définie dans la revendication 1, en présence de chacun des produits dont on souhaite déterminer les propriétés fongicides, et l'on sélectionne les produits ayant un effet inhibiteur sur cette activité.

30 7) Utilisation d'un produit sélectionné par le procédé selon la revendication 6 pour l'obtention d'un fongicide.

kinases

cdc/cdk

CIV1 (C.a.) MKLSDYYIDKELIYNSAISDIYTAIDKFNNILPVCLKIVDED-----PSLPPHSIRREVLLIKTLK--PHPNLIEYFNDIKICDDILLV---TKLYRYDLSQL
 CIV1 (S.c.) -----MKLDSDIDTHCQLVKSTRTRIYRSDTYAIKCLALD----FDIPPNNAKFYSYSLINKLG---NKCKHILPLLESKATDNN---DILILFPPEE
 Cdc28 (S.c.) -MSGELANYKRLEKVGEGETGVVYKAQDLRPGGQQRVVALKKIRLESE--DEGVPPSTAIREISLKLK--DDN---IVRLYDIVRSDAH---KLXLYVFELD
structure

bbbbb bbbbbbb
 bbbbbb bbbbbb
 aaaaaaaaaaa

kinases

cdc/cdk

CIV1 (C.a.) IEITKYCKRTTR-----FLYINGNLVSNOYTLANEIEEKDILKLUJKSMSGGLEFIHSQGLIHRDKPSNTIFFARD---DITOPLIQCDPDIICYD--
 CIV1 (S.c.) MNLYEFMOMHYKRDRRRKKNPYDILNPSIPIVADPPVQKVTN --QLDVNRYSLSFRRQMVEGTAPLMENKLTIRDKPKQNTMLTNNTSTVSPKLYLIDFCITSYDMA
 Cdc28 (S.c.) LDLKRYMEGIPK-----D--QPLGADTVKKERFMQLCKGTAYCHSHRILHDLKPKQNJLINKD----GNLKLGDFGLARAFG
structure

aaaaaaaaaaaaaaa bbhhh bbbb
 bbbbbb aaaaaa

kinase S

cdc/cdk

CIV1 (C.a.) LKLPPKODBPPMAKYIDVSTGTRKAPELLQITTYEVEIDIWMSIGLITGILGYSNF---QSIVLVDDKELJNDSHSVDSIYLINQIFENNGTGPNLTDDEDELFCDEY
 CIV1 (S.c.) NNSQTSABPMDSKVTDISTGTRKAPELLQITTYEVEIDIWMSIGLITGILGYSNF---QSIVLVDDKELJNDSHSVDSIYLINQIFENNGTGPNLTDDEDELFCDEY
 Cdc28 (S.c.) V-----PLRAYTHEITVTLWYRAPEVLLGGKQYSTGVDTWISGCIIFAMCNR-----KDIF-----SGDSE1DQIFKIFRVLGTPNEAIWPDIVYLPD-
structure

aaaaaaaaaaaaaa

kinases

cdc/cdk

CIV1 (C.a.) NNENLHPKCFNLOKYPRKWDILILPRCND-----DEMKELEFTKMRVYDRSKRITSKEIIQLMID
 CIV1 (S.c.) DAFVGMPGADGDKYVLDQEKOYQISLVERNMMPRLDEIADVVKVKOFINICLIGAVSFSPNERWSCORILQELIEKP
 Cdc28 (S.c.) -FKPSFPPQ-WRR-----KDLSQNVPS-----LDERGIDLIDKLLAYDPINRISARRAATHPYFQ...
structure

aaaaaaaaaaaaaa

FIGURE 1

LISTAGE DE SEQUENCE

<110> FAYE, Gérard
VALAY, Jean Gabriel
MANN, Carl
THURET, J an-Yves
CEA
INSTITUT CURIE
CNRS

<120> KINASE ACTIVATRICE DES PROTEINE-KINASES CYCLINE
DEPENDANTES, ET SES UTILISATIONS

<130> MJPrm263/33

<140>

<141>

<150> FR 9710287

<151> 1997-08-12

<160> 2

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1020

<212> ADN

<213> Candida albicans

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1020)

<400> 1

```

atg aag ttg tca gat tat tat ata gac aag gaa tta att tac aat agt
Met Lys Leu Ser Asp Tyr Tyr Ile Asp Lys Glu Leu Ile Tyr Asn Ser
   1           5           10          15

```

```

gcc att tct gat ata tat acg gct att gat aag ttt aat aac tta cca 96
Ala Ile Ser Asp Ile Tyr Thr Ala Ile Asp Lys Phe Asn Asn Leu Pro
          20           25           30

```

gta tgt ctt aaa ata gtt gat gaa gat ttc agt ctt cca cca cat tca 144
Val Cys Leu Lys Ile Val Asp Glu Asp Phe Ser Leu Pro Pro His Ser
35 40 45

atc cat cga gaa gtt ctt ata ctt aaa act ttg aaa cca cat cca aac 192
 Ile His Arg Glu Val Leu Ile Leu Lys Thr Leu Lys Pro His Pro Asn
 50 55 60

ata att gaa tat ttt aat gat ctt aaa att tgt gac gat att ata tta	240
Ile Ile Glu Tyr Phe Asn Asp Leu Lys Ile Cys Asp Asp Ile Ile Leu	
65 70 75 80	

gtc acc aaa ttg tat cgt tat gat ttg agt caa ttg att gaa att aca 288
 Val Thr Lys Leu Tyr Arg Tyr Asp Leu Ser Gln Leu Ile Glu Ile Thr
 85 90 95

aaa tat tgt aaa cga aca aca cga ttt att tat ggt att aat ggt aat 33
 Lys Tyr Cys Lys Arg Thr Thr Arg Phe Ile Tyr Gly Ile Asn Gly Asn
 100 105 110

ctt gtt agt aat caa tat aca ctt gct aat gaa att gaa gaa aaa gat 384
 Leu Val Ser Asn Gln Tyr Thr Leu Ala Asn Glu Ile Glu Glu Lys Asp
 115 120 125

atc aaa tta tgg tta aaa tca atg agt tca gga ctt gaa ttt att cat 432
 Ile Lys Leu Trp Leu Lys Ser Met Ser Ser Gly Leu Glu Phe Ile His
 130 135 140

tca caa ggg ata att cat cgt gat ata aaa ccc agt aat att ttc ttt 480
 Ser Gln Gly Ile Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Ser Asn Ile Phe Phe
 145 150 155 160

gcc cg^g gat gat ata aca caa ccg att att gga gat ttt gat att tgt 528
 Ala Arg Asp Asp Ile Thr Gln Pro Ile Ile Gly Asp Phe Asp Ile Cys
 165 170 175

tat gat tta aaa ctg cca cct aaa gat gaa ccc cct atg gcg aaa tat 576
 Tyr Asp Leu Lys Leu Pro Pro Lys Asp Glu Pro Pro Met Ala Lys Tyr
 180 185 190

att gat gta tct aca ggt att tat aaa gca cca gaa ttg att ctt ggt 624
 Ile Asp Val Ser Thr Gly Ile Tyr Lys Ala Pro Glu Leu Ile Leu Gly
 195 200 205

ata act aat tat gaa tat gaa att gat att tgg tca ttg ggt ata att 672
 Ile Thr Asn Tyr Glu Tyr Glu Ile Asp Ile Trp Ser Leu Gly Ile Ile
 210 215 220

ttg act ggt tta tat tca gaa aat ttt caa agt gtt tta gtc aaa gat 720
 Leu Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Asn Phe Gln Ser Val Leu Val Lys Asp
 225 230 235 240

gat aaa gaa ttg act aat gat tct cat gtt agt gat tta tat tta tta 768
 Asp Lys Glu Leu Thr Asn Asp Ser His Val Ser Asp Leu Tyr Leu Leu
 245 250 255

aat caa ata ttt gaa aat ttc ggt aca ccc aat tta act gat ttt gaa 816
 Asn Gln Ile Phe Glu Asn Phe Gly Thr Pro Asn Leu Thr Asp Phe Glu
 260 265 270

gat gaa tta ttt tgt gat gaa tat aat gaa aac ttg cat ttt aaa 864
 Asp Glu Leu Phe Cys Asp Glu Tyr Asn Asn Glu Asn Leu His Phe Lys
 275 280 285

aaa ttc aat tta caa aaa tat cct aga aaa gat tgg gat att att tta 912
 Lys Phe Asn Leu Gln Lys Tyr Pro Arg Lys Asp Trp Asp Ile Ile Leu
 290 295 300

cct cga tgc aat gat gat ttc atg aaa gaa att ttt acc aag atg att 960
 Pro Arg Cys Asn Asp Phe Met Lys Glu Ile Phe Thr Lys Met Ile
 305 310 315 320

aga tat gat cga agt aaa aga ata act tct aaa gaa atc tta caa tta 1008
 Arg Tyr Asp Arg Ser Lys Arg Ile Thr Ser Lys Glu Ile Leu Gln Leu
 325 330 335

atg tta gat tga 1020
 Met Leu Asp
 340

<210> 2
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> Candida albicans

<400> 2
 Met Lys Leu Ser Asp Tyr Tyr Ile Asp Lys Glu Leu Ile Tyr Asn Ser
 1 5 10 15

Ala Ile Ser Asp Ile Tyr Thr Ala Ile Asp Lys Phe Asn Asn Leu Pro
 20 25 30
 Val Cys Leu Lys Ile Val Asp Glu Asp Phe Ser Leu Pro Pro His Ser
 35 40 45
 Ile His Arg Glu Val Leu Ile Leu Lys Thr Leu Lys Pro His Pro Asn
 50 55 60
 Ile Ile Glu Tyr Phe Asn Asp Leu Lys Ile Cys Asp Asp Ile Ile Leu
 65 70 75 80
 Val Thr Lys Leu Tyr Arg Tyr Asp Leu Ser Gln Leu Ile Glu Ile Thr
 85 90 95
 Lys Tyr Cys Lys Arg Thr Thr Arg Phe Ile Tyr Gly Ile Asn Gly Asn
 100 105 110
 Leu Val Ser Asn Gln Tyr Thr Leu Ala Asn Glu Ile Glu Glu Lys Asp
 115 120 125
 Ile Lys Leu Trp Leu Lys Ser Met Ser Ser Gly Leu Glu Phe Ile His
 130 135 140
 Ser Gln Gly Ile Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Ser Asn Ile Phe Phe
 145 150 155 160
 Ala Arg Asp Asp Ile Thr Gln Pro Ile Ile Gly Asp Phe Asp Ile Cys
 165 170 175
 Tyr Asp Leu Lys Leu Pro Pro Lys Asp Glu Pro Pro Met Ala Lys Tyr
 180 185 190
 Ile Asp Val Ser Thr Gly Ile Tyr Lys Ala Pro Glu Leu Ile Leu Gly
 195 200 205
 Ile Thr Asn Tyr Glu Tyr Glu Ile Asp Ile Trp Ser Leu Gly Ile Ile
 210 215 220
 Leu Thr Gly Leu Tyr Ser Glu Asn Phe Gln Ser Val Leu Val Lys Asp
 225 230 235 240
 Asp Lys Glu Leu Thr Asn Asp Ser His Val Ser Asp Leu Tyr Leu Leu
 245 250 255
 Asn Gln Ile Phe Glu Asn Phe Gly Thr Pro Asn Leu Thr Asp Phe Glu
 260 265 270
 Asp Glu Leu Phe Cys Asp Glu Tyr Asn Asn Glu Asn Leu His Phe Lys
 275 280 285
 Lys Phe Asn Leu Gln Lys Tyr Pro Arg Lys Asp Trp Asp Ile Ile Leu
 290 295 300
 Pro Arg Cys Asn Asp Asp Phe Met Lys Glu Ile Phe Thr Lys Met Ile
 305 310 315 320
 Arg Tyr Asp Arg Ser Lys Arg Ile Thr Ser Lys Glu Ile Leu Gln Leu
 325 330 335
 Met Leu Asp

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No

PCT/FR 98/01788

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N9/12 C12N15/54 C12N15/81

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THURET J.Y. ET AL.: "Civ1 (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase" CELL, vol. 86, no. 4, 23 August 1996, pages 565-576, XP002065325 cited in the application see the whole document -----	1-5
A	WO 97 16447 A (MITOTIX INC.) 9 May 1997 -----	6,7

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 November 1998

Date of mailing of the international search report

07/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01788

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9716447 A	09-05-1997	US 5733920 A AU 1116497 A	31-03-1998 22-05-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der 1^e Internationale No

PCT/FR 98/01788

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 6 C12N9/12 C12N15/54 C12N15/81

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
 CIB 6 C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	THURET J.Y. ET AL.: "Civil (CAK in vivo), a novel Cdk-activating kinase" CELL, vol. 86, no. 4, 23 août 1996, pages 565-576, XP002065325 cité dans la demande voir le document en entier	1-5
A	WO 97 16447 A (MITOTIX INC.) 9 mai 1997	6,7



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 novembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/12/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document Internationale No

PCT/FR 98/01788

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9716447 A	09-05-1997	US 5733920 A AU 1116497 A	31-03-1998 22-05-1997